昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2017, 60(7): 809 - 816 doi:10.16380/j.kcxb.2017.07.009

氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂的毒性及风险评估

周 浩[#], 邵莒南[#], 翟一凡, 吴光安, 陈 浩, 门兴元, 于 毅, 郑 礼[*]

(山东省农业科学院植物保护研究所天敌与授粉昆虫研究中心, 济南 250100)

摘要:【目的】明确氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂 *Bombus terrestris* 的毒性。【方法】分别采用饲喂法和接触法测定了氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂(1∶1)对地熊蜂1日龄工蜂成虫的急性经口毒性和急性接触毒性,同时测定药剂对地熊蜂乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的影响。依据农药对蜜蜂生态风险的危害熵(hazard quotient, HQ)值评估杀虫剂对熊蜂的风险。【结果】氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂(1∶1)对地熊蜂成年工蜂急性经口毒性测定48 h时 LD_{50} 值分别为2.50,4.97和4.07 μg a.i./蜂,均表现为中毒。氟啶虫胺腈急性触杀毒性测定48 h时 LD_{50} 值为8.72 μg a.i./蜂,表现为中毒,而乙基多杀菌素及其与氟啶虫胺腈的混剂(1∶1)最高剂量120 μg a.i./蜂触杀处理未见地熊蜂死亡,表现为低毒。同时,3种药剂对地熊蜂成年工蜂的HQ值均低于50,表现为低风险。氟啶虫胺腈经口处理抑制了AChE的活性,且抑制作用随剂量增加而增强,乙基多杀菌素及其与氟啶虫胺腈的混剂(1∶1)的 LD_{60} 剂量对AChE的活性具有先激活后抑制作用。【结论】氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂(1∶1)对地熊蜂的HQ评估均表现为低风险,其中乙基多杀菌素及其与氟啶虫胺腈的混剂(1∶1)对地熊蜂的致毒作用慢于氟啶虫胺腈,且室内安全性评价表明它们的安全性高于氟啶虫胺腈。

关键词: 地熊蜂; 杀虫剂; 毒性; 中毒症状; 乙酰胆碱酯酶; 安全性评价

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2017)07-0809-08

Toxicity and risk assessment of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture to *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae)

ZHOU Hao[#], SHAO Ju-Nan[#], ZHAI Yi-Fan, WU Guang-An, CHEN Hao, MEN Xing-Yuan, YU Yi, ZHENG Li[*] (Beneficial Insects Research Center, Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clarify the toxicity of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture to the buff-tailed bumblebee, *Bombus terrestris*.【Methods】The acute oral and contact toxicities of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture (1∶1) to the 1 day-old adult workers of *B. terrestris* were measured by feeding application and topical application methods, respectively, and meanwhile the acetylcholinesterase (AChE) activity was measured. The risk of insecticides to *B. terrestris* was assessed based on the hazard quotient (HQ) values of the ecological risk of insecticides to bees.【Results】The LD_{50} values of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture (1∶1) against adult workers of *B. terrestris* at 48 h after oral exposure were 2.50, 4.97 and 4.07 μg a.i. per bee, respectively. Sulfoxaflor showed moderate toxicity to adult *B. terrestris* with the LD_{50} value of 8.72 μg a.i. per bee at 48 h by contact, and no bumblebees

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系蜂产业创新团队项目(SDAIT-24-01); 山东省农业科学院学科带头人科研启动项目; 山东省农业重大应用技术创新项目"设施蔬菜生态高效安全生产技术模式建立与示范"; 山东省农业科学院科技创新重点项目"高档蔬菜生产病虫害生态防控关键技术研究"

作者简介: 周浩, 男, 1988年生, 山东泰安人, 硕士, 研究方向为授粉昆虫的工厂化繁育, E-mail: zhouenhao@126.com; 邵莒南, 女, 1990年生, 山东济宁人, 硕士, 研究方向为农药毒理, E-mail: 15275383680@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhengli64@126.com

收稿日期 Received: 2017-03-12; 接受日期 Accepted: 2017-06-12

died after acute contact with spinetoram and its mixture with sulfoxaflor (1∶1) at 120 μg a. i. per bee. The HQ values of the three insecticides to adult workers of *B. terrestris* were all below 50, suggesting that these three insecticides present low risk to this bumblebee. Sulfoxaflor inhibited AChE activity in adult workers of *B. terrestris*, and its action strengthened with the increase of treatment dosage. After the adult workers of *B. terrestris* were treated with spinetoram and the mixture (1∶1) at LD_{60}, the AChE activities were enhanced first and then inhibited. 【Conclusion】Sulfoxaflor, spinetoram and their mixture (1∶1) show low risk to adult workers of *B. terrestris* as judged by the HQ value. The poisoning effects of spinetoram and its mixture with sulfoxaflor (1∶1) are slower than sulfoxaflor, and their safety is higher than that of sulfoxaflor in laboratory safety evaluation.

Key words: *Bombus terrestris*; insecticide; toxicity; poisoning symptom; acetylcholinesterase; safety evaluation

熊蜂是蜜蜂科(Apidae)熊蜂属 *Bombus* 的昆虫,在世界上分布广泛,种类较多,其中在我国有 150 多种。熊蜂授粉技术是目前国际上为设施果菜授粉最先进的技术之一,可以实现设施农业的优质、高效和安全生产,在发达国家已经普遍应用(Dogterom *et al*., 1998; Gabriel *et al*., 2013)。适合用熊蜂授粉的作物种类很多,目前主要是设施茄果类蔬菜,茄果类蔬菜的花少有花蜜且具有蜜蜂不喜欢的特殊气味,蜜蜂授粉效果不佳,使用熊蜂为其授粉效果更为优异。另外,熊蜂还可为温室蓝莓、瓜类以及各种果树等作物授粉,应用非常广泛(李继莲等, 2006)。

粉虱、蓟马和蚜虫等吸汁类害虫以及棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、瓜绢螟 *Diaphania indica* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等鳞翅目害虫长期严重危害设施作物的生长,温室使用对吸汁类害虫和鳞翅目害虫特效的杀虫剂较为频繁(杨琼, 2014)。氟啶虫胺腈为磺酰亚胺类杀虫剂,作用于昆虫体内的烟碱型胆碱受体内独特的结合位点(Watson *et al*., 2011),能有效防治吸汁类害虫。乙基多杀菌素是作用机制新颖的大环内酯类生物源农药产品,作用于昆虫体内的烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)和 γ-氨基丁酸(GAGB),对靶标害虫速效,能有效防治鳞翅目、双翅目的卫生害虫和缨翅目的蓟马,对蜜蜂毒性较低(Ramanaidu *et al*., 2011; Besard *et al*., 2011),主要经过微生物和光降解为碳、氢、氧、氮等自然成分(Dryden *et al*., 2013)。两者均与其他作用方式药剂无交互抗性或有较低交互抗性(Mota-Sanehez *et al*., 2006; 秦文和高菊芳, 2013),且在田间应用中均取得了较好的防治效果,应用较为广泛(林仁魁等, 2012; 李燕芳等, 2013; 宫庆涛等, 2014)。有研究表明,氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混用防治稻飞虱、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 速效且持效期长(夏华兴等, 2013),目前已有复配制剂在市场上销售,但两种农药混配使用对地熊蜂的安全性国内未见报道。由于氟啶虫胺腈和乙基多杀菌素均作用于烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR),杀虫剂与乙酰胆碱受体结合,必然会影响乙酰胆碱与乙酰胆碱受体的结合,而乙酰胆碱酯酶的主要功能是快速水解乙酰胆碱,因而这两种杀虫剂可能影响乙酰胆碱酯酶的活性(Dembélé *et al*., 1999; Gambi *et al*., 2007)。本研究通过饲喂法和接触法以及酶活性测定实验来综合探究氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂(1∶1)对地熊蜂的毒性,并对其进行了风险评估,为温室中使用熊蜂授粉提供理论基础和指导建议,以避免或减轻熊蜂在使用时被农药杀伤。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

95.9% 氟啶虫胺腈原药和 81.2% 乙基多杀菌素原药,均来自美国陶氏益农公司。氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素混剂为两单剂有效浓度比为 1∶1 的混配物。用丙酮(分析纯,≥99.5%)配制成质量浓度为 1×10^4 mg/L 的母液,于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2 供试生物

地熊蜂 *Bombus terrestris*,由山东省农业科学院植物保护研究所天敌与授粉昆虫研究中心提供。试验所用的地熊蜂均为个体大小基本一致的健康 1 日龄工蜂成虫。

1.3 急性毒性测定

测定方法参照国家环境保护局颁布的《化学农药环境安全评价试验准则, 第 10 部分: 蜜蜂急性毒性试验》(袁善奎等, 2014)。将农药对地熊蜂的毒性划分为 4 个等级(剧毒, LD_{50} ≤0.001 μg a. i./蜂; 高毒, 0.001 μg a. i./蜂 < LD_{50} ≤2.0 μg a. i./蜂; 中

毒，2.0 μg a.i./蜂 < LD_{50} ≤ 11.0 μg a.i./蜂；低毒，LD_{50} > 11.0 μg a.i./蜂）。

1.3.1　急性经口毒性：试验在温度 25 ± 2℃，相对湿度 60% ± 10%，黑暗条件下进行。将 30 头饥饿处理 2 h 的 1 日龄工蜂成虫移入蜂笼，用 50% 的蔗糖水溶液将药剂配制成 5 个剂量系列（表 1），在放有适量脱脂棉的 10 mL 培养皿中加入蔗糖水稀释的不同剂量的药剂 200 μL，将培养皿放入蜂笼，对每组药液的消耗量进行测定，每个剂量重复 3 次，并设仅含丙酮的蔗糖水为空白对照。记录 3，12，24 和 48 h 死亡地熊蜂数，同时观察不同时间的中毒症状，计算地熊蜂死亡率，同时计算混剂的共毒系数（*CTC*）。

$$死亡率(\%)=\frac{死虫数}{总虫数}\times100；$$

$$校正死亡率(\%)=\frac{处理组死亡率-对照组死亡率}{1-对照组死亡率}\times100；$$

$$共毒系数(CTC)=\frac{实测(A+B)毒力指数}{理论(A+B)毒力指数}\times100；$$

$$混剂实测毒力指数(ATI)=\frac{A单剂LD_{50}}{(A+B)\ LD_{50}}\times100；$$

A + B 的理论毒力指数（*ATI*）= A 剂的毒力指数 × A 剂在混剂中的质量百分含量 + B 剂的毒力指数 × B 剂在混剂中的质量百分含量；

$$单剂毒力指数(TI)=\frac{标准杀虫剂的LD_{50}}{供试单剂的LD_{50}}\times100。$$

1.3.2　急性接触毒性：试验在温度 25 ± 2℃，相对湿度 60% ± 10%，黑暗条件下进行。用去离子水将药剂配制成 5 个剂量系列（表 1）。用微量点滴仪（BS00279，BURKARD）将各剂量供试药液 2.0 μL 点滴在地熊蜂中胸背板处，处理 30 头地熊蜂，待蜂身晾干后转入蜂箱中，用 50% 蔗糖水饲喂，每处理重复 3 次，并设仅含丙酮的去离子水为空白对照，24 h 和 48 h 后检查并记录死亡地熊蜂数。

表 1　本研究所用药剂剂量

Table 1　Test dosages of insecticides used in this study

处理方法 Treatment methods	供试药剂 Tested insecticides	测试剂量（μg a.i. per bee） Test dosage				
饲喂法 Feeding application	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	11	5.5	2.75	1.375	0.685
	乙基多杀菌素 Spinetoram	24	12	6	3	1.5
	氟啶虫胺腈 + 乙基多杀菌素 Sulfoxaflor + Spinetoram（1∶1）	11	5.5	2.75	1.375	0.685
接触法 Topical application	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	60	30	15	7.5	3.75
	乙基多杀菌素 Spinetoram	120	60	30	15	7.5
	氟啶虫胺腈 + 乙基多杀菌素 Sulfoxaflor + Spinetoram（1∶1）	120	60	30	15	7.5

1.4　风险评估方法

农药对地熊蜂的风险评估参照欧洲和地中海植物保护组织（EPPO，2000）所采用的初步判断农药对蜜蜂生态风险的危害熵（hazard quotient，HQ）值。HQ 值为农药田间推荐用量（AR）（g a.i./hm^2）与农药对熊蜂急性经口或接触 LD_{50}（μg a.i./蜂）值的比值：$HQ = AR/LD_{50}$。HQ > 2 500，高风险；50 < HQ ≤ 2 500，中等风险；HQ ≤ 50，低风险。

本文在计算 HQ 值时，LD_{50} 值使用急性经口毒性试验 48 h 的结果，田间推荐剂量按照已在我国农业部登记的同一有效成分田间推荐用量的最大范围来计算。

1.5　乙酰胆碱酯酶活性测定

参考生物测定的结果，采用饲喂法，选取急性经口毒性试验中药剂 48 h 的 LD_{40}，LD_{60} 和 LD_{80} 剂量处理地熊蜂，在处理后 3 h 和 24 h 分别挑取存活地熊蜂的头部 0.1 ± 0.01 g，放入离心管中用液氮研磨，根据乙酰胆碱酯酶活性试剂盒（苏州科铭生物技术有限公司）说明书加入相应体积的提取液，经过离心、加入反应液和冰浴匀浆等步骤后用酶标仪（EMax Plus，Molecular Devices）进行测定，波长设置为 412 nm，每个处理重复 3 次，并以去离子水代替药液设为空白对照，根据试剂盒中的公式计算乙酰胆碱酯酶活性，单位为 nmol/min · mg pro。

1.6　数据分析

用 SPSS 19.0 软件对所得数据进行分析和计算，利用线性回归分析方法计算相应的半致死剂量 LD_{50}。不同处理组间乙酰胆碱酯酶活性的差异显著性采用 Duncan 氏新复极差法检验。

2 结果

2.1 氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂成年工蜂的急性毒性

由表 2 结果可知,氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂(1∶1)对地熊蜂的争性经口毒性由高到低依次为氟啶虫胺腈 > 氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素的混剂(1∶1) > 乙基多杀菌素。氟啶虫胺腈对地熊蜂的毒性最高,24 h 和 48 h 的 LD_{50} 值分别为 3.43 和 2.50 μg a.i./蜂;其次为氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素的混剂(1∶1),24 h 和 48 h 的 LD_{50} 值分别为 6.29 和 4.07 μg a.i./蜂,共毒系数(CTC)分别为 86 和 82,表现为相加作用;乙基多杀菌素的毒性最低,24 h 和 48 h 的 LD_{50} 值分别为 13.07 和 4.97 μg a.i./蜂。参照农药对蜜蜂急性经口毒性分级标准,氟啶虫胺腈及其与乙基多杀菌素的混剂(1∶1)对地熊蜂 24 h 的经口毒性为中毒,乙基多杀菌素为低毒。氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂(1∶1)对地熊蜂 48 h 的急性经口毒性均为中毒。

由表 3 可知,氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂(1∶1)对地熊蜂的急性接触毒性均低于急性经口毒性。氟啶虫胺腈对地熊蜂 24 h 和 48 h 的急性接触毒性分别为 9.11 和 8.72 μg a.i./蜂,表现为中毒,而乙基多杀菌素及其与氟啶虫胺腈的混剂(1∶1)120 μg a.i./蜂点滴处理未见地熊蜂死亡。

表 2 氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂成年工蜂的急性经口毒性

Table 2 Acute oral toxicity of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture to adult workers of *Bombus terrestris*

处理时间(h) Treatment time	供试药剂 Tested insecticides	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient	LD_{50} ($CL_{0.95}$) (μg a.i. per bee)	毒性等级 Toxicity level
24	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	$y = 0.8984x + 4.5193$	0.9506	3.43 (2.36 – 4.97)	中毒 Moderate
	乙基多杀菌素 Spinetoram	$y = 0.8486x + 4.0526$	0.9871	13.07 (10.39 – 16.46)	低毒 Low
	氟啶虫胺腈 + 乙基多杀菌素 Sulfoxaflor + Spinetoram (1∶1)	$y = 0.7111x + 4.4323$	0.987	6.29 (5.00 – 7.90)	中毒 Moderate
48	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	$y = 0.8422x + 4.6649$	0.9839	2.50 (2.04 – 3.06)	中毒 Moderate
	乙基多杀菌素 Spinetoram	$y = 0.9997x + 4.3042$	0.9866	4.97 (4.12 – 5.98)	中毒 Moderate
	氟啶虫胺腈 + 乙基多杀菌素 Sulfoxaflor + Spinetoram (1∶1)	$y = 0.7318x + 4.5538$	0.9875	4.07 (3.37 – 54.93)	中毒 Moderate

试虫为 1 日龄成年工蜂;以下各表和图同。The 1 day-old adult workers were used as the test insects. The same for the following tables and figures.

表 3 氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂成年工蜂的急性接触毒性

Table 3 Acute contact toxicity of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture to adult workers of *Bombus terrestris*

处理时间(h) Treatment time	供试药剂 Tested insecticides	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient	LD_{50} ($CL_{0.95}$) (μg a.i. per bee)	毒性等级 Toxicity leve
24	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	$y = 2.6097x + 2.4966$	0.9971	9.11 (8.38 – 9.89)	中毒 Moderate
	乙基多杀菌素 Spinetoram	–	–	>120 (–)	低毒 Low
	氟啶虫胺腈 + 乙基多杀菌素 Sulfoxaflor + Spinetoram (1∶1)	–	–	>120 (–)	低毒 Low
48	氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	$y = 2.5154x + 2.6347$	0.9893	8.72 (7.40 – 10.26)	中毒 Moderate
	乙基多杀菌素 Spinetoram	–	–	>120 (–)	低毒 Low
	氟啶虫胺腈 + 乙基多杀菌素 Sulfoxaflor + Spinetoram (1;1)	–	–	>120 (–)	低毒 Low

CL: 置信限 Confidence limit.

2.2　氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂经口处理后地熊蜂成年工蜂的中毒症状和死亡率

氟啶虫胺腈经口处理的地熊蜂成年工蜂出现中毒症状的时间较短，11 μg a. i. /蜂处理后 2 – 3 min 地熊蜂出现中毒症状，且中毒症状出现时间随着剂量的增加而缩短。地熊蜂的前期中毒症状表现为：肢体不协调，爬行摇晃，原地打圈或四处乱撞，翻倒-爬起-翻倒，地熊蜂的后期中毒症状表现为：仰躺在地上挣扎，随着气力的消耗，挣扎幅度越来越小，直到死亡；氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混剂（1∶1） 11 μg a. i. /蜂经口处理后 25 – 30 min 地熊蜂出现中毒症状，症状与氟啶虫胺腈相似。乙基多杀菌素 22 μg a. i. /蜂处理后 12 h 地熊蜂出现中毒症状，明显慢于氟啶虫胺腈及其与乙基多杀菌素的混剂（1∶1）处理，乙基多杀菌素处理的地熊蜂中毒症状为仰躺，四肢不由自主地颤抖，从剧烈到微弱，直到死亡。

氟啶虫胺腈经口处理的地熊蜂死亡率上升最快，3 h 死亡率达到 37%；其次为氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混剂（1∶1）处理，3 h 死亡率为 27%；而乙基多杀菌素处理组死亡率上升较慢，在 3 h 死亡率为 0，显著低于氟啶虫胺腈及其与乙基多杀菌素的混剂（1∶1）处理。但是在 24 h，氟啶虫胺腈处理的地熊蜂死亡率为 43%，乙基多杀菌素及其与氟啶虫胺腈的混剂（1∶1）处理组死亡率均达到 37%，3 个处理组之间差异不显著。之后的 36 h 与 48 h，不同处理组的地熊蜂死亡率差异不显著（图 1）。

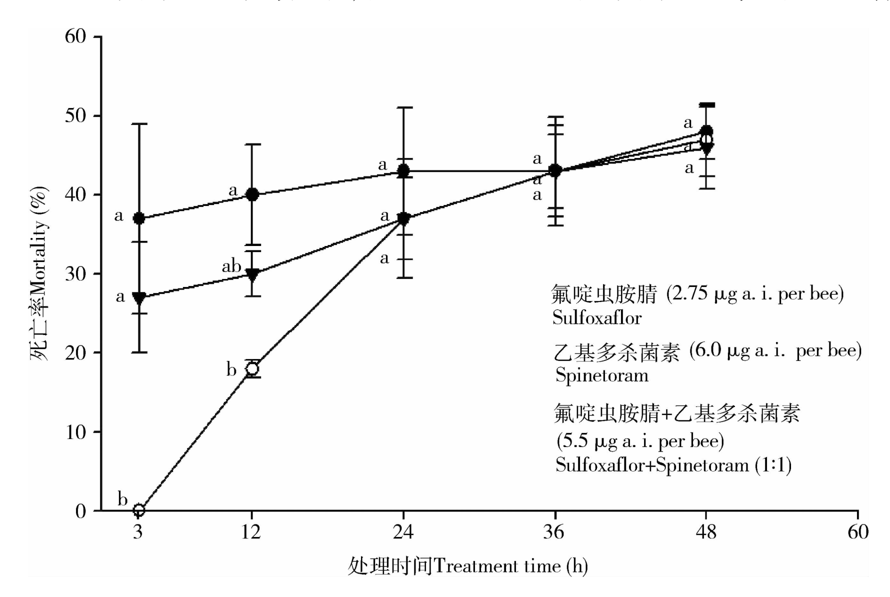


图 1　致死中剂量氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂处理不同时间后地熊蜂成年工蜂的死亡率

Fig. 1　Mortality of adult workers of *Bombus terrestris* after treatment with sulfoxaflor, spinetoram and their mixture at the median lethal dose for different time

数据为平均值 ± 标准误；线上不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著（$P<0.05$）。Data are mean ± *SE*. Different letters above lines indicate significant difference by Duncan's new multiple range test（$P<0.05$）.

2.3　氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂成年工蜂的风险评估

依据农药对蜜蜂生态风险的 HQ 值评估杀虫剂对熊蜂的风险，由表 4 可以看出，氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素单剂及其混剂（1∶1）对地熊蜂的 HQ 值均低于 50，表现为低风险。

2.4　氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂经口处理对地熊蜂成年工蜂乙酰胆碱酯酶活性的影响

分别使用 LD_{40}，LD_{60} 和 LD_{80} 剂量的氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素单剂及其混剂（1∶1）饲喂地熊蜂工蜂成虫 3 h 和 24 h，乙酰胆碱酯酶活性的变化趋势如图 2。

氟啶虫胺腈处理 3 h 和 24 h 后地熊蜂的乙酰胆碱酯酶活性显著低于对照组（均为 $F=31.215$；$P=0.0001$），且随着药剂剂量的增加酶活性逐渐降低，至 LD_{80} 达到最强抑制（图 2：A）；而乙基多杀菌素处理组处理 3 h 的地熊蜂乙酰胆碱酯酶活性相比对照明显被激活（$F=18.286$；$P=0.0001$），至 LD_{60} 达到最大激活，酶活力为对照的 1.52 倍（图 2：B），处理后 24 h 地熊蜂的 AChE 活力被抑制（$F=18.286$；$P=0.0001$）（图 2：B）；氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素的混剂（1∶1）LD_{60} 处理3 h的地熊蜂乙酰胆

表 4 氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素及其混剂对地熊蜂成年工蜂的经口危害熵(HQ)值

Table 4 The hazard quotient(HQ) values of sulfoxaflor, spinetoram and their mixture to adult workers of *Bombus terrestris* after oral exposure

供试药剂 Tested insecticides	LD_{50} (μg a.i. per bee)	田间推荐剂量(g a.i./hm^2) Field recommended dose	HQ 值 HQ value
氟啶虫胺腈 Sulfoxaflor	2.50	15.0 - 97.5	6.00 - 39.00
乙基多杀菌素 Spinetoram	4.97	45.0 - 75.0	9.05 - 15.09
氟啶虫胺腈 + 乙基多杀菌素 Sulfoxaflor + Spinetoram (1∶1)	4.07	9.0 - 52.5	2.21 - 12.90

HQ 值为农药田间推荐用量与农药对熊蜂急性经口或接触 LD_{50} 值的比值。HQ value is the ratio of the field recommended dose to the LD_{50} value by oral or direct contact exposure.

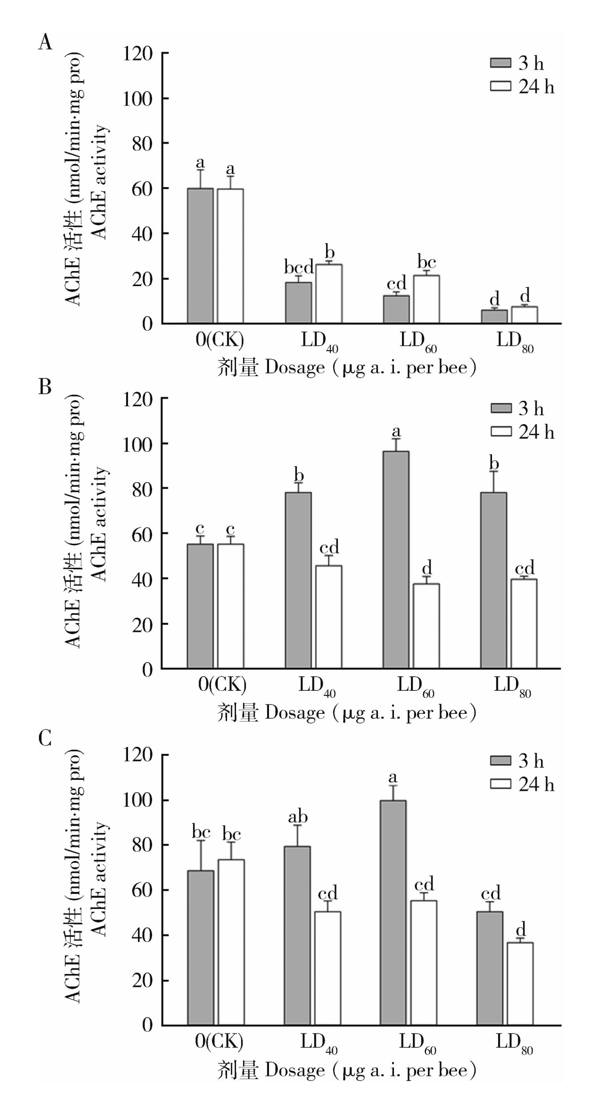


图 2 氟啶虫胺腈(A)、乙基多杀菌素(B)及其混剂(1∶1)(C)对地熊蜂成年工蜂头部乙酰胆碱酯酶活性的影响

Fig. 2 Effects of sulfoxaflor (A), spinetoram (B) and their mixture (1∶1) (C) on the AChE activity in the head of adult workers of *Bombus terrestris*

以去离子水为对照。数据为平均值 ± 标准误；柱上不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Distilled water was used as the control. Data are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

碱酯酶活性相比对照被激活($F=7.462$; $P=0.0005$)(图 2：C)，LD_{40} 和 LD_{80} 处理与对照相比差异不显著，而处理 24 h 的 AChE 活性被抑制($F=7.462$; $P=0.0005$)(图 2：C)。

3 讨论

试验结果表明，氟啶虫胺腈对地熊蜂成年工蜂急性经口和接触处理均表现为中毒，这与氟啶虫胺腈对蜜蜂表现为高毒(European Food Safety Authority, 2014)不同，可能是熊蜂体表绒毛多并且自身表面积/体积比低造成了熊蜂对杀虫剂的敏感性低于其他蜂类(Thompson and Hunt, 1999)，也可能是因为所试蜂种不同。氟啶虫胺腈经口处理地熊蜂后，地熊蜂出现中毒症状较早，且出现中毒症状的时间随着剂量的增加而缩短，同时乙酰胆碱酯酶的活性随着剂量的增加而降低，这说明地熊蜂乙酰胆碱酯酶活性随着其出现中毒症状时间的缩短而降低。有研究表明蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶基因表达量与行为习惯和学习能力有关(Shapira *et al.*, 2001)，同时蜜蜂的许多生命活动与乙酰胆碱酯酶活性相关，乙酰胆碱酯酶活性被抑制，蜜蜂的生理功能会受到影响(靳三省等, 2015)。因此氟啶虫胺腈处理地熊蜂出现的中毒症状可能与乙酰胆碱酯酶活性的异常有关，乙酰胆碱酯酶活性被抑制后，使乙酰胆碱在突触处积累，过量的乙酰胆碱造成去极化阻断，抑制了正常的神经冲动的传递，引起了行为紊乱，最终导致昆虫死亡(Fournier and Mutero, 1994)。

乙基多杀菌素经口处理地熊蜂 24 h 的毒性为低毒，而处理 48 h 的毒性为中毒，死亡率上升较为缓慢，出现中毒症状也较为缓慢，但最终死亡率较高，同时乙基多杀菌素对切叶蜂 *Megachile rotundata* 致死作用较慢，但最终死亡率也较高(Gradish *et al.*, 2012a)。这可能与乙基多杀菌素处理的地熊蜂乙

酰胆碱酯酶活性先被激活后被抑制有关，说明乙基多杀菌素及其与氟啶虫胺腈的混剂（1∶1）处理初期地熊蜂对药剂产生了应激反应，持续上调乙酰胆碱酯酶的表达来解毒，但随着处理时间的延长，药剂在虫体内累积量超过其自身代谢解毒能力，乙酰胆碱酯酶活性受到抑制，药剂毒性随之升高。乙基多杀菌素对地熊蜂的急性接触毒性低于急性经口毒性，对 *Bombus impatiens* 的急性接触毒性也低于其急性经口毒性（Gradish *et al.*，2012b），这可能与乙基多杀菌素主要起胃毒作用有关。Mayes 等（2003）报道乙基多杀菌素对蜜蜂、熊蜂和切叶蜂室内表现高毒，但在田间对飞行的蜜蜂较为安全，没有发现蜜蜂的死亡率、觅食行为和繁育的异常现象，说明乙基多杀菌素在田间使用更为安全，这可能与乙基多杀菌素对熊蜂的急性接触毒性较低以及其挥发性较低（华乃震，2015）有关。

氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混剂（1∶1）LD_{60}处理地熊蜂对其乙酰胆碱酯酶活性有激活作用，LD_{40}和 LD_{80}处理延缓了对地熊蜂乙酰胆碱酯酶活性的影响，这可能是造成在此处理下地熊蜂出现中毒症状时间晚于氟啶虫胺腈且其前期死亡率也低于氟啶虫胺腈的原因。氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混剂（1∶1）对地熊蜂的急性经口毒性为中毒，表现为两单剂的相加作用，而氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混剂（1∶1）对地熊蜂的急性接触毒性为低毒，120 μg a. i. /蜂点滴处理未见地熊蜂死亡，可能是与乙基多杀菌素的结合阻碍了氟啶虫胺腈在地熊蜂体内的渗透和吸收。

氟啶虫胺腈、乙基多杀菌素单剂及其混剂（1∶1）处理对乙酰胆碱酯酶活性的抑制作用不同并引起了不同的中毒症状，原因可能是两单剂化学结构及具体的靶标结合位点不同，氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混剂（1∶1）的具体作用机制有待进一步研究。乙基多杀菌素及其与氟啶虫胺腈的混剂（1∶1）对地熊蜂的致毒作用慢于氟啶虫胺腈且室内安全性高于氟啶虫胺腈，三者对地熊蜂均表现为低风险，其在温室及大田使用对地熊蜂的安全性有待进一步研究。

参考文献（References）

Besard L, Mommaerts V, Abdu-Alla G, 2011. Lethal and sublethal side-effect assessment supports a more benign profile of spinetoram compared with spinosad in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Pest Manag. Sci.*, 67(5): 541 – 547.

Dembélé K, Haubruge E, Gaspar C, 1999. Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62(6): 731.

Dogterom MH, Matt eoni JA, Plowright RC, 1998. Pollination of greenhouse tomatoes by the North American *Bombus vosnesenskii* (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 91(1): 71 – 75.

Dryden MW, Ryan WG, Bel M, Rumschlag AJ, Young LM, Snyder DE, 2013. Assessment of owner-administered monthly treatments with oral spinosad or topical spot-on fipronil/(S)-methoprene in controlling fleas and associated pruritus in dogs. *Vet. Parasitol.*, 191(3 – 4): 340 – 346.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2000. Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products, No. 170: side effects on honeybees. *IOBC/WPRS Bull.*, 23: 51 – 55.

European Food Safety Authority, 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flutianil. *EFSA J.*, 12(8): 3805.

Fournier D, Mutero A, 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 108(1): 19 – 31.

Gabriel E, Roxana CS, Catalina GB, Patricia S, Gastón C, Rodrigo M, 2013. Assessing the impact of the invasive buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*) on the pollination of the native Chilean herb *Mimulus luteus*. *Arthropod Plant Interact.*, 7(4): 467 – 474.

Gambi N, Pasteris A, Fabbri E, 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 145(4): 678 – 685.

Gong QT, Wu HB, Zhang KP, Li SH, Zhang XP, Sun RH, 2014. Laboratory activity and field efficacy of sulfoxaflor against *Aphis citricola*. *Agrochemicals*, 53(10): 759 – 761, 772. [宫庆涛，武海斌，张坤鹏，李素红，张学萍，孙瑞红，2014. 氟啶虫胺腈对苹果黄蚜室内毒力测定及田间防治效果. 农药，53(10): 759 – 761, 772]

Gradish AE, Scott-Dupree CD, Cutler GC, 2012a. Susceptibility of *Megachile rotundata* to insecticides used in wild blueberry production in Atlantic Canada. *J. Pest Sci.*, 85(1): 133 – 140.

Gradish AE, Scott-Dupree CD, Frewin AJ, Cutler GC, 2012b. Lethal and sublethal effects of some insecticides recommended for wild blueberry on the pollinator *Bombus impatiens*. *Can. Entomol.*, 144(3): 478 – 486.

Hua NZ, 2015. A review of green biological insecticide spinosad and spinetoram. *Agrochemicals*, 54(1): 1 – 5, 13. [华乃震，2015. 绿色环保生物杀虫剂多杀霉素和乙基多杀菌素的述评. 农药，54(1): 1 – 5, 13]

Jin SX, Meng LF, Diao QY, 2015. Effect of sublethal doses of imidacloprid on acetylcholinesterase activity in *Apis mellifera*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(2): 315 – 323. [靳三省，孟丽峰，刁青云，2015. 吡虫啉对意大利蜜蜂乙酰胆碱酯酶的亚致死效应. 应用昆虫学报，52(2): 315 – 323]

Li JL, Peng WJ, Wu J, An JD, Guo ZB, Tong YM, Huang JX, 2006. Strawberry pollination by *Bombus lucorum* and *Apis mellifera* in greenhouses. *Acta Entomol. Sin.*, 49(2): 342-348. [李继莲, 彭文君, 吴杰, 安建东, 国占宝, 童越敏, 黄家兴, 2006. 明亮熊蜂和意大利蜜蜂为温室草莓的授粉行为比较观察. 昆虫学报, 49(2): 342-348]

Li YF, Xiao HX, Zhang Y, Xie ZN, Huang XP, Wang P, Yao ZW, 2013. Indoor toxicity and field efficacy of spinetoram against larvae of rice leaf roller, *Canphalocrocis medinalis* Guenée. *J. South. Agric.*, 44(8): 1282-1285. [李燕芳, 肖汉祥, 张扬, 谢忠能, 黄新培, 王彭, 姚振威, 2013. 乙基多杀菌素对稻纵卷叶螟室内毒力测定及田间药效试验. 南方农业学报, 44(8): 1282-1285]

Lin RK, Zou HJ, Wu DF, 2012. Field efficacy of sulfoxaflor 240g/L SC against *Nilapavata lugens*. *Agrochemicals*, 51(8): 619-620. [林仁魁, 邹华娇, 吴德飞, 2012. 氟啶虫胺腈对褐飞虱的田间防治效果. 农药, 51(8): 619-620]

Mayes MA, Thompson GD, Husband B, Miles MM, 2003. Spinosad toxicity to pollinators and associated risk. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 179: 37-71.

Mota-Sanehez D, Hollingworth RM, Grafius EJ, Moye DD, 2006. Resistance and cross-resistance to neanicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag. Sci.*, 62(1): 30-37.

Qin W, Gao JF, 2013. Resistance and cross-resistance of spinosad. *World Pestic.*, 35(4): 16-22. [秦文, 高菊芳, 2013. 多杀菌素类杀虫剂的抗性与交互抗性. 世界农药, 35(4): 16-22]

Ramanaidu K, Hardman JM, Percival DC, Cutler GC, 2011. Laboratory and field susceptibility of blueberry spanworm (Lepidoptera: Geometridae) to conventional and reduced-risk insecticides. *Crop Prot.*, 30(12): 1643-1648.

Shapira M, Thompson CK, Soreq H, Robinson GE, 2001. Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. *J. Molec. Neurosci.*, 17(1): 1-12.

Thompson HM, Hunt LV, 1999. Extrapolating from honeybees to bumblebees in pesticide risk assessment. *Ecotoxicology*, 8(3): 147-166.

Watson GB, Loso MR, Babcock JM, Hasler JM, Letherer TJ, Young CD, Zhu YM, Casida JE, Sparks TC, 2011. Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(7): 432-439.

Xia HX, Chen ML, Liu WX, Wang JS, 2013. Integrated use of sulfoxaflor and spinetoram for the control of migratory pests in rice field. *Mod. Agrochem.*, 12(3): 52-53. [夏华兴, 陈明亮, 刘维新, 王健生, 2013. 氟啶虫胺腈与乙基多杀菌素混用防治水稻迁飞性害虫田间药效试验. 现代农药, 12(3): 52-53]

Yang Q, 2014. Occurrence Dynamics Vegetable of Insect Pests and Their Natural Enemies in Greenhouses and the Influence of Insecticides on the Major Natural Enemies. MSc Thesis, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [杨琼, 2014. 温室大棚蔬菜害虫和天敌发生动态及药剂对主要害虫天敌的影响. 山东泰安: 山东农业大学硕士学位论文]

Yuan SK, Xu H, Qu WG, Shan ZJ, Bu YQ, Yan QP, Wang HL, 2014. GB/T 31270.10-2014. Test Guidelines on Environmental Safety Assessment for Chemical Pesticides, Part 10: Acute Toxicity Test of Bees. Standards Press of China, Beijing. [袁善奎, 徐晖, 瞿唯钢, 单正军, 卜元卿, 严清平, 王会利, 2014. GB/T 31270.10-2014. 化学农药环境安全评价试验准则, 第 10 部分: 蜜蜂急性毒性试验. 北京: 中国标准出版社]

(责任编辑: 赵利辉)